

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA**

CAMILA MARÍNGOLO RIBEIRO

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A FLUOROQUINOLONAS E
AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium
tuberculosis***

ARARAQUARA, SP

2018

CAMILA MARÍNGOLO RIBEIRO

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A FLUOROQUINOLONAS E
AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Bacteriologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rogério Pavan

ARARAQUARA,SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PERFIL DE RESISTÊNCIA A FLUOROQUINOLONAS E AMINOGLICOSÍDEOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis*


AUTORA: CAMILA MARINGOLO RIBEIRO

ORIENTADOR: FERNANDO ROGÉRIO PAVAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FERNANDO ROGÉRIO PAVAN
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP


Profa. Dra. KATIANY RIZZIERI CALEFFI FERRACIOLI
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Universidade Federal de Maringá


Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 21 de fevereiro de 2018

Dedico ao meu amor, meus pais e meu irmão.
Agradeço a Deus por mais uma etapa concluída.

Agradeço ao meu orientador Prof. Fernando Pavan e aos colegas de laboratório por todo aprendizado e pela confiança.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Tuberculose (TB) é a doença infecciosa que mais mata pessoas no mundo e é causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Em 2016, 10,4 milhões de pessoas desenvolveram a doença e 1,8 milhão morreu em sua decorrência. Atualmente o principal agravante deste cenário é a resistência do bacilo aos antimicrobianos disponíveis para o tratamento. Entre os principais mecanismos responsáveis pela resistência aos antimicrobianos, as mutações em genes que codificam os alvos dos fármacos se destacam. Fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são duas classes de antimicrobianos de 2ª linha utilizados no tratamento de TB e atuam na proteína DNA girase e no ribossomo bacteriano impedindo o processo de transcrição e síntese proteica respectivamente. Mutações nos genes *gyrA* e *rrs* que codificam estes alvos podem ser responsáveis por tal resistência. Para que medidas de saúde pública possam ser tomadas para otimizar o tratamento, é preciso conhecer a que os isolados clínicos são resistentes e qual o mecanismo envolvido neste processo. Para isso, uma biblioteca com 100 isolados clínicos coletados entre 2007 e 2009 no hospital de referência Clemente Ferreira da cidade de São Paulo foi avaliada em relação a resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. A primeira etapa foi a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de três antibióticos da classe das fluoroquinolonas (ofloxacino, moxifloxacino e gatifloxacino) e três da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, canamicina e estreptomicina) frente a 100 isolados clínicos utilizando um ensaio de microdiluição em placas de 96 poços. Conhecendo a CIM, os isolados clínicos resistentes a pelo menos um antimicrobiano foram selecionados para o estudo do possível mecanismo de resistência. Mutações nos genes *gyrA* e *rrs* que pudessem ser responsáveis por tal resistência foram pesquisadas utilizando o kit GenoType MTBDRsl. Observou-se que 31% (31/100) destas cepas foi resistente a pelo menos um aminoglicosídeo testado, 22% (22/100) a pelo menos uma fluoroquinolona e 10% (10/100) delas são XDR-TB (resistente a rifampicina, isoniazida e pelo menos uma fluoroquinolona e um aminoglicosídeo). O kit detectou mutações em 61,3% (19/31) dos resistentes a aminoglicosídeos e 59,1% (13/22) dos resistentes a fluoroquinolonas. Estes resultados indicam que além das 2 mutações avaliadas no gene *rrs* e das 6 mutações no gene *gyrA* outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos e devem ser analisados para ampliar a compreensão sobre a resistência a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas nesta biblioteca.

Palavras-chaves: *Mycobacterium tuberculosis*. Isolados clínicos. Resistência a antibióticos. Aminoglicosídeos. Fluoroquinolonas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a most deadly infectious disease of people in the world and is mainly caused by the *Mycobacterium tuberculosis* bacillus. In 2016, 10.4 million people developed disease and 1.8 million died. Currently, the main aggravating factor of this scenario is the resistance of the bacillus to the antimicrobials available for treatment. Among the main mechanisms for resistance to antimicrobials, the mutations in genes that code the targets of the drugs stand out. Fluoroquinolones and aminoglycosides are two classes of antimicrobials of 2nd line for TB treatment and they act on protein DNA gyrase and on the bacterial ribosome impeding the process of transcription and protein synthesis respectively. Mutations in the *gyrA* and *rrs* genes encoding these targets may be explain the resistance. Public health guidelines are taken to optimize treatment and for this it is necessary to know what clinical isolates resistant and what mechanism are is involved in the process. For this, a library with 100 clinical isolates collected between 2007 and 2009 at a Clemente Ferreira reference hospital in the city of São Paulo was evaluated for resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides. A first stage was the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of three fluoroquinolone antibiotics (ofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin) and three of the class of aminoglycosides (amikacin, kanamycin and streptomycin) against 100 clinical isolates using a microdilution assay in 96-well plates. According to the MIC, clinical isolates resistant to at least one antimicrobial were selected for the study of the possible mechanism of resistance. Mutations in the *gyrA* and *rrs* genes were scree ned using the GenoType MTBDRsl kit because it may explain the resistance. It was found that 31% (31/100) of these strains were resistant to at least one aminoglycoside tested, 22% (22/100) to at least one fluoroquinolone and 10% (10/100) of them are XDR-TB (resistant to rifampicin, isoniazid and at least one fluoroquinolone and an aminoglycoside). The kit detects mutations in 61.3% (19/31) of the aminoglycoside resistant and 59.1% (13/22) of the resistant fluoroquinolones. These results indicate that, in addition to the 2 mutations investigated in the *rrs* gene and the 6 mutations investigated in the *gyrA* gene, other mechanisms of resistance may be involved should be analyzed to broaden the understanding of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones in this library.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical isolates. Antibiotic resistance. Aminoglycoside; Fluoroquinolone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de mecanismos de resistência a antibióticos (Fonte: autora)...	20
Figura 2 – Estrutura molecular de moxifloxacino, gatifloxacino e ofloxacino, antibióticos da classe das fluoroquinolonas. (Fonte: autora).....	21
Figura 3 – Estrutura molecular de amicacina, canamicina e estreptomicina, antibióticos da classe dos aminoglicosídeos. (Fonte: autora).	21
Figura 4 - Diagrama das famílias de bombas de efluxo, os antibióticos que podem sofrer efluxo por cada uma delas e moléculas com atividade inibidora de bombas de efluxo. Fonte:(PULE et al., 2016).	24
Figura 5 – Esquema metodológico utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima de acordo com Palomino et al 2002 com modificações.	28
Gráfico 1 - Concentração inibitória mínima de amicacina ($\mu\text{g/mL}$) frente 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
Gráfico 2 - Concentração inibitória mínima de estreptomicina ($\mu\text{g/mL}$) de 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
Gráfico 3 - Concentração inibitória mínima de canamicina ($\mu\text{g/mL}$) de 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33
Gráfico 4 - Concentração inibitória mínima de ofloxacino ($\mu\text{g/mL}$) de 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
Gráfico 5 - Concentração inibitória mínima de moxifloxacino ($\mu\text{g/mL}$) de 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
Gráfico 6 - Concentração inibitória mínima de gatifloxacino ($\mu\text{g/mL}$) de 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
Diagrama 1 – Diagrama de Venn indicando a resistência cruzada entre os antibióticos amicacina, canamicina e estreptomicina da classe dos aminoglicosídeos entre os 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> testados e entre os 47 isolados clínicos multifármaco resistentes (MDR).	39
Diagrama 2 - Diagrama de Venn indicando a resistência cruzada entre os antibióticos moxifloxacino, gatifloxacino e ofloxacino da classe das fluoroquinolonas entre os 100 isolados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> testados e entre os 47 isolados multifármaco resistentes (MDR).	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos de antibióticos recomendados pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento de tuberculose (2011).	13
Tabela 2 – Indicação terapêutica, segundo a Organização Mundial da Saúde, para RR-TB e MDR-TB (2016).	16
Tabela 3 – Possíveis mudanças na classificação de antibióticos utilizados para o tratamento de tuberculose proposta por Tiberi et al, 2017.	18
Tabela 4 – Mutações genéticas relacionadas a resistência a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Tabela 5 – Concentração crítica ($\mu\text{g/mL}$) para classificação de resistência aos fármacos de segunda linha amicacina, canamicina, estreptomicina, ofloxacino, moxifloxacino, gatifloxacino e de primeira linha isoniazida e rifampicina baseado no protocolo do kit <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Plate.	29
Tabela 6 – Mutações analisadas pelo Kit GenoType MTBDRs/ (Hain Lifescience®) que podem ser responsáveis pela resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
Tabela 7 - Resistência cruzada entre antibióticos da classe das fluoroquinolonas e aminoglicosídeos em uma biblioteca de 100 cepas clínicas brasileiras e entre as 47 cepas desta biblioteca que são MDR-TB.	38
Tabela 8 - Concentração inibitória mínima e mutações genéticas detectadas pelo kit GenoType MTBDRs/ versão 1.0 nos isolados clínicos resistentes a aminoglicosídeos.	44
Tabela 9 - Concentração inibitória mínima e mutações genéticas detectadas pelo kit GenoType MTBDRs/ versão 1.0 nos isolados clínicos resistentes a fluoroquinolonas.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMK	Amicacina
FLQ	Fluoroquinolonas
GAT	Gatifloxacino
INH	Isoniazida
KAN	Canamicina
MDR-TB	Tuberculose multifármaco resistente (<i>“multidrug resistant tuberculosis”</i>)
MOX	Moxifloxacino
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
OFL	Ofloxacino
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de polimerização em cadeia (<i>“Polymerase chain reaction”</i>)
REMA	Ensaio de microdiluição utilizando resazurina (<i>“Resazurin Microtiter Plate Assay”</i>)
RIF	Rifampicina
RR-TB	Tuberculose resistente a rifampicina (<i>“rifampicin resistant tuberculosis”</i>)
STP	Estreptomicina
TB	Tuberculosis
TDR-TB	Tuberculose totalmente resistente a fármacos (<i>“Totally drug resistant tuberculosis”</i>)
XDR-TB	Tuberculose extensivamente resistente a fármacos (<i>“extensively drug resistant tuberculosis”</i>)
XXDR-TB	Tuberculose extremamente resistente a fármaco (<i>“extremely drug-resistant”</i>)

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
Capítulo I.....	11
1. Introdução.....	12
1.1. Tuberculose: epidemiologia e tratamento	12
1.2. Mecanismo de resistência.....	18
1.2.1. Modificação do alvo do Fármaco	20
1.2.2. Bombas de efluxo	23
2. Desenvolvimento	26
2.1. Objetivos	26
2.1.1. Objetivo geral.....	26
2.1.2. Objetivos específicos.....	26
2.2. Material e Métodos.....	26
2.2.1. Recuperação dos isolados clínicos.....	26
2.2.2. Determinação da Concentração inibitória mínima	27
2.2.3. Pesquisa de mutações nos genes <i>gyrA</i> e <i>rrs</i> nas cepas resistentes	29
2.3. Resultados e Discussão.....	32
3. Conclusão.....	48
Capítulo II.....	58

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Tuberculose: epidemiologia e tratamento

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa bacteriana causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e que atinge principalmente os pulmões, mas que pode se disseminar por outros órgãos. Em 2015, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 10,4 milhões de pessoas desenvolveram esta doença no mundo (sendo 1,2 milhão de pessoas HIV-positivas). Das 10,4 milhões de pessoas: 5,9 milhões eram homens; 3,5 milhões eram mulheres e 1,0 milhão era criança. Um milhão e oitocentas mil pessoas morreram devido à doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Em 2016, o número de casos da doença se manteve, foram 10,4 milhões sendo que 6,3 milhões foram de novos casos. A população que desenvolveu TB em 2016 apresentou as seguintes características: 90% eram adultos e 65% eram homens (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Estima-se que entre 2 e 3 bilhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *Mtb*, no entanto uma pequena proporção, cerca de 5 a 15%, desenvolverá a doença durante sua vida, mas o fato de aproximadamente um terço da população mundial albergar o bacilo em seus pulmões é uma barreira que dificulta a erradicação da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

O Brasil, no ranking mundial, ocupa a 18ª posição em relação ao número de casos de TB, em 2015, foram 75.526 casos notificados. No Brasil houveram 75.526 casos de TB notificados em 2015, 12.337 foram casos recidivos, ou seja, aqueles que já receberam algum tratamento mas não obtiveram sucesso, e este número representa 16,3% do total (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Na tabela 1 são apresentados os antibióticos recomendados para o tratamento segundo a OMS. Eles são classificados em grupos e os grupos 2, 3, 4 e 5 são utilizados quando o grupo 1, que são os antibióticos de 1ª linha, não obtém sucesso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008, 2011).

Tabela 1 – Grupos de antibióticos recomendados pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento de tuberculose (2011).

Grupo	Antibióticos
Grupo 1 Medicamentos orais de primeira linha	Isoniazida Rifampicina Etambutol Pirazinamida Rifabutina
Grupo 2 Medicamentos injetáveis	Canamicina Amicacina Capreomicina
Grupo 3 Fluoroquinolonas	Ofloxacino Levofloxacino Moxifloxacino Gatifloxacino
Grupo 4 Medicamentos orais bacteriostáticos de 2ª linha	Etionamida Protionamida Cicloserina Terizidona Ácido <i>p</i> -aminosalicílico
Grupo 5 Medicamentos não recomendados rotineiramente e usados para tratar casos de resistência aos grupos anteriores	Clofazimina Linezolida Amoxicilina + clavulanato Imipenem Claritromicina Tiocetazona Alta dose de isoniazida

FONTE: Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2011(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008, 2011).

Com o desenvolvimento da doença, o esquema terapêutico empregado atualmente para o tratamento, no Brasil e recomendado pela OMS, é composto por uma fase intensiva (2 meses de Rifampicina (RIF), Isoniazida (INH), Pirazinamida e Etambutol) seguido de uma fase de manutenção (4 meses de RIF e INH) totalizando seis meses de tratamento. A rifabutina é classificada como antibiótico de 1ª linha e é empregada em substituição a rifampicina quando o paciente também faz terapia antirretroviral (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008, 2010, 2017).

Esta terapia que combina mais de um antibiótico é chamada de poliquimioterapia e foi introduzida há mais de 50 anos com o objetivo de reduzir a emergência de isolados resistentes considerando que os antibióticos escolhidos tem mecanismos de ação distintos e dessa forma seria possível combater os mutantes naturalmente resistentes dentro de uma população (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008, 2010, 2016b).

A taxa de cura para os casos de TB sensível é de pelo menos 85%, segundo a OMS, entretanto ainda existem casos em que o esquema terapêutico básico não é capaz de levar a cura do paciente. Há duas razões principais para esta falha terapêutica: abandono da terapia e infecção por isolados resistentes a antibióticos, e estas duas razões inter-relacionam-se. O abandono ou não adesão a terapia, ou seja, casos em que o paciente inicia o tratamento, mas não o finaliza ou não o faz de maneira assídua, geram uma pressão seletiva que podem selecionar bacilos naturalmente resistentes e assim, o tratamento deixa de ser efetivo. Quando ocorre a seleção destes bacilos naturalmente resistentes, eles podem infectar novos paciente, ocasionando uma infecção em que o esquema terapêutico básico não será eficaz. Sendo assim a falta de adesão a terapia anti-TB gera um prejuízo tanto para o indivíduo quanto para a comunidade, sendo necessários esquemas terapêuticos mais longos, mais tóxicos e mais caros (JOHNSON et al., 2009; SZUMOWSKI; ADAMS; EDELSTEIN, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

A classificação da resistência utilizada nas estimativas globais é feita com base nos fármacos de primeira linha (RIF e INH) ou de segunda linha (fluoroquinolonas (FLQ) e fármacos injetáveis). Isolados multifármaco resistentes (MDR-TB - "*Multidrug resistant tuberculosis*") são resistentes a pelo menos dois fármacos de primeira linha para o tratamento: RIF e INH. Já as cepas extensivamente resistentes (XDR-TB - "*extensively drug resistant tuberculosis*") são classificadas assim quando há resistência a RIF, INH, a uma FLQ (Por exemplo: ofloxacino (OFL), moxifloxacino (MOX) e gatifloxacino (GAT)) e pelo menos um fármaco injetável de segunda linha (Por exemplo: Amicacina (AMK), Canamicina (KAN) ou Capreomicina)(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Em 2016, a OMS emitiu um comunicado para que as pessoas com *Mtb* resistente a RIF (RR-TB), com ou sem resistência adicional a outros antibióticos

deveriam receber o tratamento preconizado para MDR-TB, portanto as estimativas passaram a ser feitas levando em consideração tanto as cepas MDR-TB quanto as RR-TB (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

De acordo com esta nova classificação, a OMS atualizou as indicações terapêuticas para RR-TB e MDR-TB, que estão apresentadas na tabela 2. Segundo esta indicação, pacientes com RR-TB ou MDR-TB devem receber um tratamento com pelo menos cinco medicamentos, sendo durante a fase intensiva: a pirazinamida e mais quatro fármacos secundários, sendo um do grupo A, um do grupo B e pelo menos dois do grupo C. Se houver resistência detectada a um destes fármacos, ele deve ser retirado do esquema terapêutico e deve ser adicionado um agente do grupos D2 ou um do grupo D3, para totalizar cinco fármacos. Se a pirazinamida não puder ser utilizada, o regime pode ser reforçado com um fármaco do grupo C ou D (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c; TIBERI et al., 2017).

Em 2016, mundialmente observou-se que 4,1% (2,8-5,3% - intervalo de confiança de 95%) dos novos casos de TB foram casos de MDR/RR-TB e 19% (9,8-27% - intervalo de confiança de 95%) dos casos recidivos, ou seja, pessoas que já receberam algum tratamento, mas não foram curadas. Em valores absolutos, estas porcentagens representam 600 mil casos de RR-TB e foram 490 mil casos de MDR-TB (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a)

Segundo a OMS, em 2016, houve cerca de 82.676 casos notificados de TB no Brasil e 5,4 mil mortes ocorreram devido a TB, excluindo os casos de coinfeção TB e vírus HIV. Dos quase 83 mil casos de TB no Brasil, estima-se que cerca de 2,4 mil eram MDR/RR-TB (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Tabela 2 – Indicação terapêutica, segundo a Organização Mundial da Saúde, para RR-TB e MDR-TB (2016).

Grupo		Antibióticos
Grupo A Fluoroquinolonas		Levofloxacino
		Moxifloxacino
		Gatifloxacino
Grupo B Medicamentos injetáveis		Canamicina
		Amicacina
		Capreomicina (Estreptomicina)
Grupo C		Etionamida
		Protionamida
		Cicloserina
		Terizidona
		Linezolida
		Clofazimina
Grupo D	D1	Etambutol
		Pirazinamida
		Alta dose de isoniazida
	D2	Bedaquilina
		Delamanida
	D3	Ácido <i>p</i> -aminosalicílico
		Imipenem + cilastatina
		Amixicilina + clavulanato
		Meropenem
	Tiocetazona	

RR-TB = tuberculose resistente a rifampicina; MDR-TB = tuberculose multifármaco resistente (resistência a rifampicina e isoniazida).

FONTE: (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c).

Em 2006 na Itália, foram descritos dois isolados clínicos com resistência a RIF, INH, PZA, ETB, STP, AMK, KAN, FLQ, etionamida, ácido para-aminossalicílico, CAP, D-cicloserina, rifabutina, clofazimina, dapsona, claritromicina e tiocetazona, foi sugerida a nomenclatura de XXDR-TB (“*extremely drug-resistant tuberculosis*”) que significa extremamente resistente a fármacos e em ambos os casos os pacientes faleceram em 94 meses e em 60 meses após o início do tratamento (MIGLIORI et al., 2007).

No Irã, em 2009, foram relatados 15 isolados clínicos resistentes a INH, RIF, STP, OFL, AMK etambutol, pirazinamida, etionamida, ácido para-aminossalicílico, D-cicloserina e ciprofloxacino. Estes isolados clínicos foram divulgados na literatura

como totalmente resistente a fármacos (*totally drug-resistant* TB ou TDR-TB) mostrando que as alternativas terapêuticas disponíveis estão cada vez menos eficientes(VELAYATI et al., 2009). Os isolados TDR também já foram relatadas na Índia (ZARIR F. UDWADIA et al., 2012). Embora essa nomenclatura não seja adotada pela OMS, sem dúvida, evidenciam uma preocupação em relação ao avanço de resistência aos antibióticos disponíveis e em relação aos novos fármacos disponíveis para seu tratamento.

Organizações governamentais americanas estão realizando ensaios clínicos empregando aminoglicosídeos e/ou FLQ como alternativas terapêuticas para reduzir o tempo de tratamento e como possíveis protocolos terapêuticos para o tratamento de cepas resistentes(NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2014, 2015a, 2015b, 2015c).

A combinação de PZA com uma FLQ de 3ª geração (MOX e GFX) tem sido a melhor alternativa terapêutica para as cepas MDR-TB. Logo, é extremamente relevante compreender o nível e a prevalência de resistência a estes fármacos para avaliar a possibilidade de introduzi-los como alternativas terapêuticas em regimes mais curtos de tratamento para TB. Os dados quanto ao nível de resistência de fármacos de segunda linha ainda são limitados(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Tiberi e colaboradores, 2017 analisaram a classificação de antibióticos disponíveis para o tratamento de TB segundo OMS de 2011 e de 2016 e de forma independente propuseram uma possível lista para uma futura reclassificação, que está apresentada na tabela 3. O equilíbrio entre o benefício esperado e o risco de danos e não adesão foram levados em consideração para determinar aumento ou redução na importância de alguns antibióticos no futuro (TIBERI et al., 2017).

Tabela 3 – Possíveis mudanças na classificação de antibióticos utilizados para o tratamento de tuberculose proposta por Tiberi et al, 2017.

Grupo	Antibióticos
Grupo A Fluoroquinolonas	Moxifloxacino Gatifloxacino Levofloxacino
Grupo B	Bedaquilina Delamanida Etionamida / Protionamida Cicloserina / Terizidona Linezolida Clofazimina
Grupo C Medicamentos injetáveis	Amicacina Canamicina Capreomicina Meropenem + Clavulanato
Grupo D	Etambutol Pirazinamida Alta dose de isoniazida Ácido <i>p</i> -aminosalicílico Amoxicilina + Clavulanato Rifabutina

FONTE: Classifying new anti-tuberculosis drugs: rationale and future perspectives (TIBERI et al., 2017)

1.2. Mecanismo de resistência

Os mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos para evadir dos antimicrobianos empregados no tratamento são quatro e estão listados abaixo (COHEN; BISHAI; PYM, 2014) e também estão esquematizados na figura 1.

1. Modificação do alvo do fármaco: este é o principal mecanismo envolvido em resistência a antibiótico para *Mtb*. A modificação do alvo pode ser decorrente de mutações genéticas que levam à transcrição ou tradução de alvo modificado e com baixa ou reduzida afinidade com o antibiótico, visto que são mutações genéticas que podem acontecer naturalmente, e os mutantes naturalmente resistentes podem ser selecionados, como por exemplo: mutações no gene *gyrA* levam a tradução de uma proteína GyrA

modificada, uma vez que *gyrA* é uma subunidade proteica da enzima DNA girase modificada. A DNA girase é inibida por FLQ, no entanto na presença de algumas mutações, essa inibição deixa de acontecer e ou é minimizada, levando a resistência do *Mtb* a esta classe de antibióticos (GINSBURG; GROSSET; BISHAI, 2003; MALIK et al., 2012; MARURI et al., 2012; LI et al., 2014b). Outro mecanismo que pode levar a modificação do alvo são alterações enzimáticas pós-traducionais ou pós-transcricionais, como por exemplo: a proteína *GidB* (codificada pelo gene *gidB*) é uma enzima metilase que pode modificar guaninas do RNA ribossomal (rRNA) e assim reduzir a afinidade de ligação entre alguns aminoglicosídeos e seu alvo que é o rRNA.

2. Modificação da via de ativação: este mecanismo é especialmente importante para os pró-fármacos, pois dependem de enzimas que modificam suas moléculas e o produto desta reação se ligará a um alvo e apresentará uma atividade antibacteriana. Como exemplo, podemos citar INH e pirazinamida, que dependem de ativação pelas enzimas *KatG* e *PncA*, respectivamente, logo mutações nos genes que codificam estas proteínas levam a resistência a pró-fármaco em questão (KONNO; FELDMANN; MCDERMOTT, 1967; SEIFERT et al., 2015; YANG et al., 2015).
3. Inativação enzimática: é o mecanismo envolvido com a resistência aos β -lactâmicos, os quais por muito tempo não foram empregados para o tratamento de TB, pois *Mtb* naturalmente possui enzimas β -lactamases que inativam tais antibióticos. Com o avanço das cepas resistentes e associando o uso dos β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases como o clavulanato, eles passaram a ser empregados para o tratamento de casos de MDR-TB e XDR-TB (CHAMBERS et al., 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c).
4. Aumento do Efluxo dos antibióticos: As bombas de efluxo são proteínas cuja função é o transporte transmembrana e na presença de antibióticos, essas proteínas podem atuar expulsando-os do interior da bactéria, logo a ação dos antibióticos é reduzida e torna possível a sobrevivência da bactérias (SANTANGELO et al., 2001) (DE ROSSI et al., 2002).

Em *Mtb*, a transferência horizontal de genes de resistência mediada por plasmídeos ou elementos de transposons não tem sido relatada (ZAINUDDIN; DALE, 1990; SMITH; WOLFF; NGUYEN, 2013; NGUYEN, 2017).

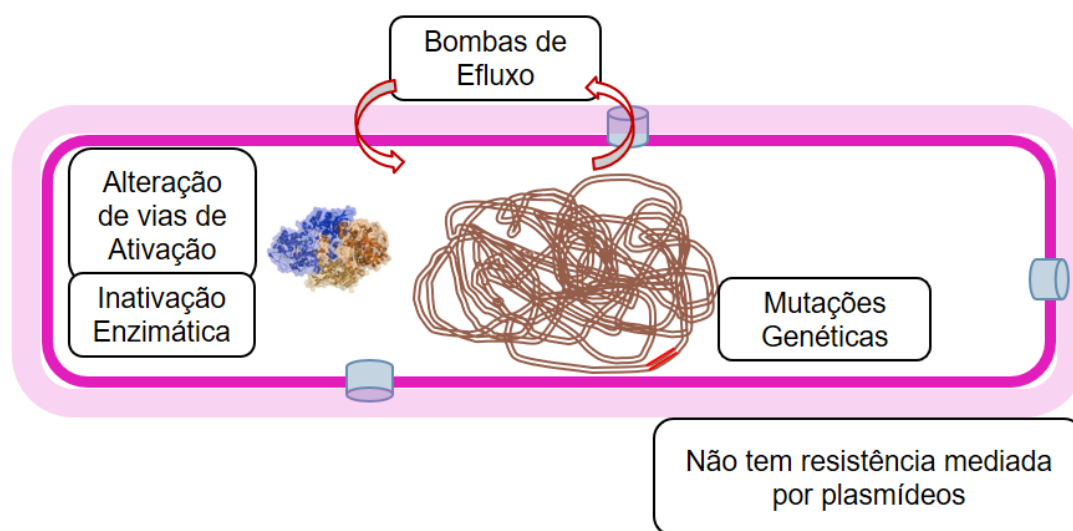


Figura 1 – Esquema de mecanismos de resistência a antibióticos (Fonte: autora).

1.2.1. Modificação do alvo do Fármaco

A modificação molecular dos alvos terapêuticos é consequência de mutações no DNA bacteriano.

As FLQ atuam inibindo a enzima DNA girase inibindo a forquilha de replicação (BRYSKIER, 1993; DRLICA; MALIK, 2003; DRLICA et al., 2009). A DNA girase tem duas subunidades: A e B, que são codificadas respectivamente pelos genes *gyrA* e *gyrB* (COLE et al., 1998). A estrutura molecular dos antibióticos desta classe que agem neste alvo gênico e que foram utilizados neste trabalho, estão na figura 2.

Mutações nos códons 88, 90, 91 e 94 de *gyrA* podem resultar cepas resistentes a FLQ. Alguns exemplos de mutações no gene *gyrA* que levam a um nível de resistência estão apresentadas na tabela 4.

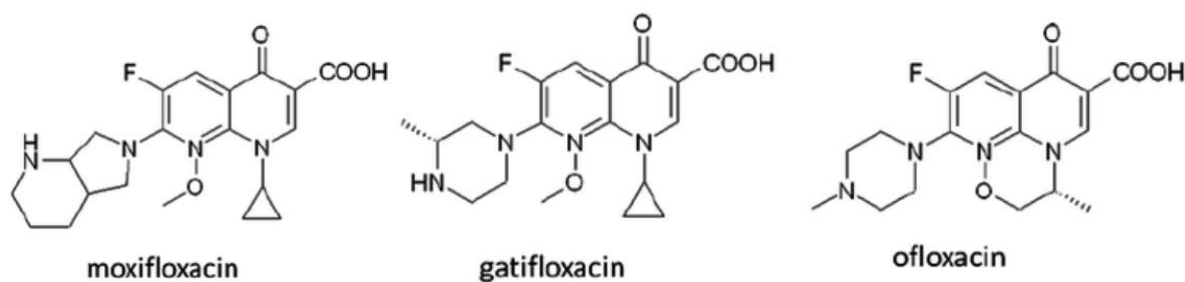


Figura 2 – Estrutura molecular de moxifloxacino, gatifloxacino e ofloxacino, antibióticos da classe das fluoroquinolonas. (Fonte: autora).

Os aminoglicosídeos (STP, KAN e AMK) ligam-se a subunidade 30S do ribossomo micobacteriano inibindo a síntese proteica (PALOMINO; MARTIN, 2014). A STP se liga a proteína ribossomal S12 (codificada pelo gene *rpsL*) e ao RNA ribossomal (rRNA) 16S (codificado pelo gene *rrs*), logo, mutações nestes dois genes levam a resistência a STP (MCCLATCHY et al., 1977; FINKEN et al., 1993; HONORÉ; COLE, 1994), enquanto AMK e KAN ligam-se diretamente a rRNA (gene *rrs*). A estrutura molecular dos aminoglicosídeos utilizados neste trabalho estão na figura 3 e as mutações relacionadas a resistência desta classe de antibióticos estão na tabela 4.

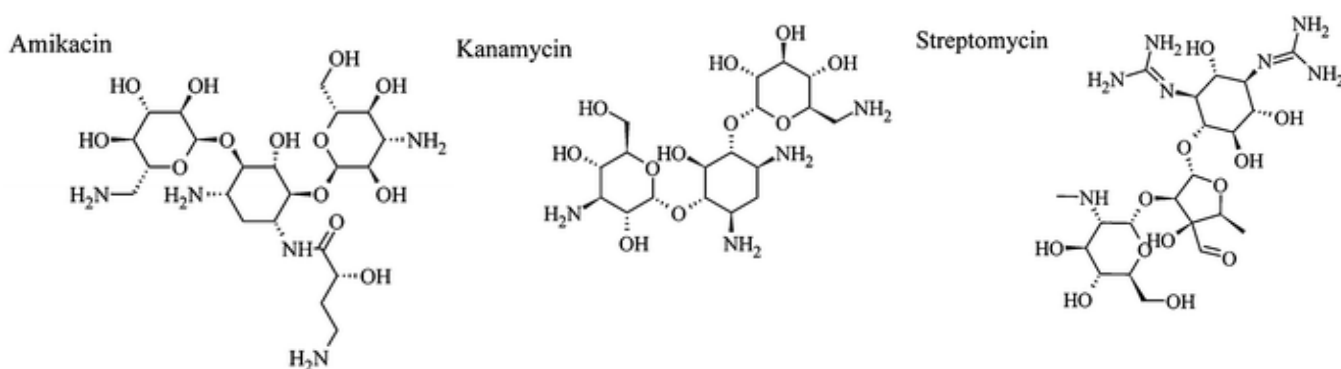


Figura 3 – Estrutura molecular de amicacina, canamicina e estreptomicina, antibióticos da classe dos aminoglicosídeos. (Fonte: autora).

Tabela 4 – Mutações genéticas relacionadas a resistência a aminoglicosídeos e fluoroquinolonas em *Mycobacterium tuberculosis*.

Gene	Proteína/RNA	Mutação	Antibiótico	Referência
<i>gyrA</i>	DNA girase Subunidade A	Ala90Val Asp94Gly Asp94AsnN Asp94Ala	Alta resistência a FLQ	(TAKIFF et al., 1994)
		Ala74Ser	Baixa resistência a MOX	(MALIK et al., 2012)
		Ala74Ser + Asp94Gly	Resistência a todas as FLQ	
<i>gyrB</i>	DNA girase Subunidade B	Asn538Asp Glu540Val Arg485Cys+Thr539Asn	Ciprofloxacino, MOX, LFX, OFL	(MALIK et al., 2012)
		Thr539Asn Thr539Pro Asn538Thr+Thr546Met	Baixa resistência a MOX	
		Lys42Arg	STP	
		Lys43Arg Lys88Arg	STP	
<i>rrs</i>	RNA ribossomal	C904G e C904A	STP	(HONORÉ; COLE, 1994)
		A1400G	AMK, KAN e STP	(ALANGADEN et al., 1998).
		G1484T	KAN e AMK	(JNAWALI et al., 2013)
<i>gidB</i>	7- metilguanosina metiltransferase	G518 (Região do loop 530)	Baixo nível de resistência a STP	(OKAMOTO et al., 2007) (WONG et al., 2011; SUN et al., 2016)

<i>eis</i>	Proteína de aumento da sobrevivência intracelular	Região promotora	Resistência a KAN e baixa resistência a AMK	(ZAUNBRECHER et al., 2009) (JNAWALI et al., 2013).
		Thr25Ala	AMK, KAN, STP e capreomicina	(JNAWALI et al., 2013)

AMK = amicacina; KAN = canamicina; STP = estreptomicina; MOX = moxifloxacino; OFL = ofloxacino; GAT = gatifloxacino; FLQ = fluoroquinolona.

1.2.2. Bombas de efluxo

Há casos que se detecta a resistência fenotípica a antibióticos, no entanto, na análise genotípica não são encontradas mutações genéticas que explicariam esta resistência. Sendo assim, outros mecanismos de resistência passam a ser analisados, como por exemplo: o aumento do efluxo dos antibióticos, ou seja, o antibiótico não consegue atingir seu alvo ou não consegue atingi-lo em concentração suficiente porque é expulso por proteínas que ficam na membrana plasmática bacteriana e tem a função de eliminar compostos tóxicos. O aumento no efluxo pode ser decorrente de uma maior atividade das proteínas de efluxo ou devido a um aumento na transcrição destes genes e este mecanismo de resistência já foi reportado para diferentes classes de antibióticos (BALGANESH et al., 2012)(OH et al., 2017). O aumento do efluxo é um mecanismo de resistência que pode coexistir com outro, como as mutações genéticas, e assim, a somatória de diferentes abordagens pode conferir ao microrganismo um maior nível de resistência (MACHADO et al., 2017).

As bombas de efluxo bacteriano são categorizadas em cinco superfamílias distintas com diferentes morfologias estruturais, especificidades de substrato e fontes de energia. São elas: a superfamília ABC (“ATP-binding cassette”), a superfamília MFS (“Major Facilitator Superfamily”), a superfamília SMR (“Small Drug Resistance Family”), a superfamília RND (“Resistance Nodulation and Division

Family”) e a superfamília MATE/ETC (“*The Multidrug and Toxic Compounds Extrusion Family*”).

As proteínas das famílias MFS, SMR, RND e MATE são transportadores secundários, nas quais o efluxo de uma molécula é acoplado ao influxo de prótons e/ou íons sódio. Na figura 4, é mostrado um diagrama comparando o mecanismo de ação das cinco famílias de proteínas de efluxo existentes, de uma forma geral para as bactérias. Nela são citados alguns dos substratos utilizados por cada família, assim como seu mecanismo de efluxo/influxo. Essas bombas utilizam, frequentemente, a força motora do fluxo de prótons. Em contraste, os membros da família ABC fazem uso do ATP como fonte de energia. O genoma de *Mtb* contém genes que codificam transportadores de efluxo de todas essas famílias (COLE et al., 1998; DE ROSSI et al., 2002; WEBBER; PIDDOCK, 2003; PULE et al., 2016).

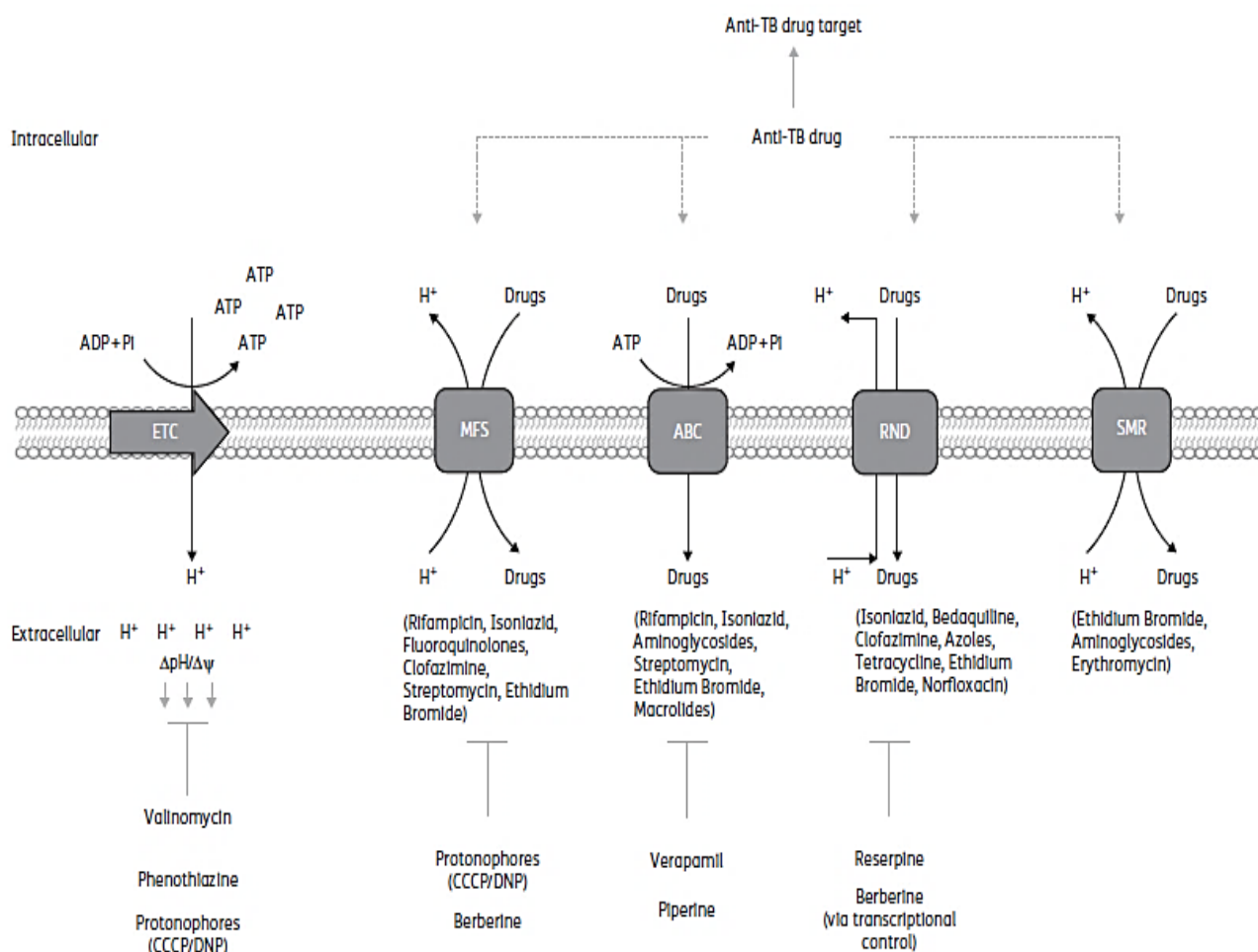


Figura 4 - Diagrama das famílias de bombas de efluxo, os antibióticos que podem sofrer efluxo por cada uma delas e moléculas com atividade inibidora de bombas de efluxo. Fonte:(PULE et al., 2016).

A crescente emergência de cepas com resistência aos antibióticos justifica o estudo de cepas de *Mtb* de origem brasileira visando determinar a prevalência e o mecanismo de resistência para FLQ e aminoglicosídeos. Visto que essas são duas classes de antibióticos de 2ª linha com grande potencial anti-*Mtb* e que se destacam como possíveis fármacos de 1ª escolha para o tratamento no futuro.

3. Conclusão

Foram analisadas 100 isolados clínicos quanto a sua susceptibilidade a aminoglicosídeos e FLQ. Observou-se que 31% foi resistente a pelo menos um aminoglicosídeo testado, 22% a pelo menos uma FLQ e destes isolados clínicos 10% são XDR, ou seja, resistente a RIF, INH, pelo menos uma FLQ e um aminoglicosídeo. O Kit GenoType MTBDRsl detectou mutações que determinam o mecanismo de resistência de 61,3% (12/31) dos resistentes a aminoglicosídeos e 59,1% (12/21) dos resistentes a FLQ, mostrando que outros mecanismos de resistência devem ser analisados nestas cepas clínicas para elucidar completamente o mecanismo de resistência envolvido, como por exemplo, mutações e outros códon dos genes avaliados (*gyrA* e *rrs*), ou ainda em outros genes (*rpsL* e *gyrB*) ou ainda pela ação de bombas de efluxo, sendo que este mecanismo de resistência poderia ser avaliado genotipicamente (analisando a expressão dos genes de bombas de efluxo utilizando RT-PCR) ou fenotipicamente (utilizando brometo de etídio ou combinando com potenciais inibidores de bombas de efluxo).

Referências

ALANGADEN, G. J.; KREISWIRTH, B. N.; AOUAD, A.; KHETARPAL, M.; IGNO, F. R.; MOGHAZEH, S. L.; MANAVATHU, E. K.; LERNER, S. A. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1295–1297, 1998.

ARJOMANDZADEGAN, M.; GRAVAND, S. Analysis of *rpsL* and *rrs* genes mutations related to streptomycin resistance in Mdr and Xdr clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberkuloz ve toraks**, v. 63, n. 4, p. 235–242, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26963306>>.

BALGANESH, M.; DINESH, N.; SHARMA, S.; KURUPPATH, S.; NAIR, A. V.; SHARMA, U. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in

antituberculosis activity of potential drug candidates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2643–2651, 2012.

BRYSKIER, A. Fluoroquinolones: mechanisms of action and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 3, p. 151–183, 1993.

CHAMBERS, H. F.; MOREAU, D.; YAJKO, D.; MIICK, C.; WAGNER, C.; HACKBARTH, C.; KOCAGÖZ, S.; ROSENBERG, E.; HADLEY, W. K.; NIKAIDO, H. Can penicillins and other beta-lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2620–4, 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

COHEN, K. A.; BISHAI, W. R.; PYM, A. S. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Genetics of Mycobacteria**, v. 2, n. 3, p. 413–429, 2014.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/31159>>.

DA SILVA, P. E. A.; VON GROLL, A.; MARTIN, A.; PALOMINO, J. C. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–9, 2011.

DE ROSSI, E.; ARRIGO, P.; BELLINZONI, M.; SILVA, P. E. A.; MARTÍN, C.; AÍNSA, J. A.; GUGLIERAME, P.; RICCARDI, G.; DE ROSSI, E. The Multidrug Transporters Belonging to Major Facilitator Superfamily (MFS) in *Mycobacterium*

tuberculosis. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 11, p. 714–724, 2002.

DRLICA, K.; HIASA, H.; KERNS, R.; MALIK, M.; MUSTAEV, A.; ZHAO, X. Quinolones: Action and Resistance Updated. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 11, p. 981–998, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182077/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182077/pdf/CTMC-9-981.pdf>>.

DRLICA, K.; MALIK, M. Fluoroquinolones: Action and Resistance. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, n. February, p. 249–282, 2003.

DU, Q.; DAI, G.; LONG, Q.; YU, X.; DONG, L.; HUANG, H.; XIE, J. Mycobacterium tuberculosis rrs A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin in clinical isolates from mainland China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 2, p. 138–142, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.031>>.

FINKEN, M.; KIRSCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A.; BÖTTGER, E. C. Molecular basis of streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 1239–1246, 1993.

GINSBURG, A. S.; GROSSET, J. H.; BISHAI, W. R. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 7, p. 432–442, 2003.

HEYSELL, S. K.; PHOLWAT, S.; MPAGAMA, S. G.; PAZIA, S. J.; KUMBURU, H.; NDUSILO, N.; GRATZ, J.; HOUP, E. R.; KIBIKI, G. S. Sensititre MycoTB plate compared to bactec MGIT 960 for first- and second-line antituberculosis drug susceptibility testing in Tanzania: A call to operationalize MICs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 11, p. 7104–7108, 2015.

HONORÉ, N.; COLE, S. T. Streptomycin Resistance in Mycobacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 2, p. 238–242, 1994.

JNAWALI, H. N.; YOO, H.; RYOO, S.; LEE, K. J.; KIM, B. J.; KOH, W. J.; KIM, C. K.; KIM, H. J.; PARK, Y. K. Molecular genetics of Mycobacterium tuberculosis

resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 975–982, 2013.

JOHNSON, J. L.; HADAD, D. J.; DIETZE, R.; LEONOR, E.; MACIEL, N.; SEWALI, B.; GITTA, P.; OKWERA, A.; MUGERWA, R. D.; ALCANESES, M. R.; QUELAPIO, M. I.; TUPASI, T. E.; HORTER, L.; DEBANNE, S. M.; EISENACH, K. D.; BOOM, W. H. Shortening Treatment in Adults with Noncavitary Tuberculosis and 2-Month Culture Conversion. n. 8, p. 1–6, 2009.

KONNO, K.; FELDMANN, F. M.; MCDERMOTT, W. Pyrazinamide Susceptibility and Amidase Activity of Tubercle Bacilli. **American Review of Respiratory Disease**, v. 95, n. 3, p. 461–469, 1967.

LEMUS, D.; ECHEMENDÍA, M.; DÍAZ, R.; LLANES, M. J.; SUÁREZ, L.; MARRERO, A. Antituberculosis Drug Resistance in Pulmonary Isolates of Mycobacterium tuberculosis, Cuba 2012 – 2014. **MEDICC Review**, v. 19, n. 1, p. 10–15, 2017.

LI, J.; GAO, X.; LUO, T.; WU, J.; SUN, G.; LIU, Q.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; MEI, J. Association of gyrA / B mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 3, n. 0, p. 0, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emi.2014.21>>.

LI, J.; GAO, X.; LUO, T.; WU, J.; SUN, G.; LIU, Q.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; MEI, J.; GAO, Q. Association of gyrA/B mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 3, n. 3, p. e19, 2014b. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/emi.2014.21>>.

MACHADO, D.; COELHO, T. S.; PERDIGÃO, J.; PEREIRA, C.; COUTO, I.; PORTUGAL, I.; MASCHMANN, R. D. A.; RAMOS, D. F.; VON GROLL, A.; ROSSETTI, M. L. R.; SILVA, P. A.; VIVEIROS, M. Interplay between mutations and efflux in drug resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 1–18, 2017.

MALIK, S.; WILLBY, M.; SIKES, D.; TSODIKOV, O. V.; POSEY, J. E. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

MARURI, F.; STERLING, T. R.; KAIGA, A. W.; BLACKMAN, A.; VAN DER HEIJDEN, Y. F.; MAYER, C.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 819–831, 2012.

MAYER, C.; TAKIFF, H. The Molecular Genetics of Fluoroquinolone Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. n. May 2016, p. 1–22, 2014.

MCCLATCHY, J. K.; KANES, W.; DAVIDSON, P. T.; MOULDING, T. S. Cross-resistance in *M. tuberculosis* to kanamycin, capreomycin and viomycin. **Tubercle**, v. 58, n. 1, p. 29–34, 1977.

MENDES, N. H. N. H.; MELO, F. A.; SANTOS, A. C.; PANDOLFI, J. R. J. R.; ALMEIDA, E. A.; CARDOSO, R. F.; BERGHS, H.; DAVID, S.; JOHANSEN, F. K.; ESPANHA, L. G. L. G.; LEITE, S. R.; LEITE, C. Q. Characterization of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in São Paulo city, Brazil. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 269, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160979/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160979/pdf/1756-0500-4-269.pdf>>.

MIGLIORI, G. B.; DE IACO, G.; BESOZZI, G.; CENTIS, R.; CIRILLO, D. M. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. **Euro Surveill**, v. 12, n. 20, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.2807/esw.12.20.03194-en>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 13, 2016.

MIYATA, M.; PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; MARINO, L. B.; HIRATA, M. H.; CARDOSO, R. F.; DE MELO, F. A. F.; ZANELLI, C. F.; LEITE, C. Q. F. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil: Phenotypic

and genotypic methods. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 6, p. 456–459, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332211000606>>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Brief Bactericidal Activity of Anti-Tuberculosis Drugs (BBA)**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02236078?term=moxifloxacin&recrs=abc&cond=%22Tuberculosis+Infections%22&draw=1&rank=4.>>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Pragmatic Clinical Trial for a More Effective Concise and Less Toxic MDR-TB Treatment Regimen(s)**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02589782?term=moxifloxacin&recrs=abc&cond=%22Tuberculosis+Infections%22&draw=1&rank=7.>>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of High-Dose Rifapentine and Moxifloxacin for Treatment of Tuberculosis (S31PK/PD)**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02563327?term=moxifloxacin&recrs=abc&cond=%22Tuberculosis+Infections%22&draw=1&rank=1.>>.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **The Evaluation of a Standard Treatment Regimen of Anti-tuberculosis Drugs for Patients With MDR-TB (STREAM)**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02409290?term=moxifloxacin&recrs=abc&cond=%22Tuberculosis+Infections%22&draw=1&rank=9.>>.

NGUYEN, L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. **Arch. Toxicol**, v. 90, n. 7, p. 1585–1604, 2017.

OH, T. S.; KIM, Y. J.; KANG, H. Y.; KIM, C.-K.; CHO, S. Y.; LEE, H. J. RNA expression analysis of efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 111–115, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134817300023>>.

OKAMOTO, S.; TAMARU, A.; NAKAJIMA, C.; NISHIMURA, K.; TANAKA, Y.;

TOKUYAMA, S.; SUZUKI, Y.; OCHI, K. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1096–1106, 2007.

PALOMINO, J.; MARTIN, A. Drug Resistance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 317–340, 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-6382/3/3/317/>>.

PALOMINO, J.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobail Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PULE, C. M.; SAMPSON, S. L.; WARREN, R. M.; BLACK, P. A.; VAN HELDEN, P. D.; VICTOR, T. C.; LOUW, G. E. Efflux pump inhibitors: Targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 17–26, 2016.

SANTANGELO, P. a Z.; ROMANO, M. I.; SILVA, P. E. a; BIGI, F.; MARTI, C.; CATALDI, A.; WESTERN, B.; RECENTLY, P. Characterization of P55, a Multidrug Ef ux Pump in. **Society**, v. 45, n. 3, p. 800–804, 2001.

SEIFERT, M.; CATANZARO, D.; CATANZARO, A.; RODWELL, T. C. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

SMITH, T.; WOLFF, K. A.; NGUYEN, L. Molecular Biology of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Current Topics in Microbiology Immunology**, v. 6, n. 4, p. 23–27, 2013.

SUN, H.; ZHANG, C.; XIANG, L.; PI, R.; GUO, Z.; ZHENG, C.; LI, S.; ZHAO, Y.; TANG, K.; LUO, M.; RASTOGI, N.; LI, Y.; SUN, Q. Characterization of mutations in streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Sichuan, China and the association between Beijing-lineage and dual-mutation in gidB. **Tuberculosis**, v. 96, p. 102–106, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.09.004>>.

SZUMOWSKI, J. D.; ADAMS, K. N.; EDELSTEIN, P. H. Antimicrobial Efflux Pumps and Mycobacterium tuberculosis Drug Tolerance: Evolutionary Considerations. n. December 2012, p. 81–108, 2013.

TAKIFF, H. E.; SALAZAR, L.; GUERRERO, C.; PHILIPP, W.; HUANG, W. M.; KREISWIRTH, B.; COLE, S. T.; JACOBS, W. R.; TELENTI, A. Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance Cloning and Nucleotide Sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB Genes and Detection of Quinolone Resistance Mutations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 4, p. 773–780, 1994.

TIBERI, S.; SCARDIGLI, A.; CENTIS, R.; D'AMBROSIO, L.; MUÑOZ-TORRICO, M.; SALAZAR-LEZAMA, M. Á.; SPANEVELLO, A.; VISCA, D.; ZUMLA, A.; MIGLIORI, G. B.; CAMINERO LUNA, J. A. Classifying new anti-tuberculosis drugs: rationale and future perspectives. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 181–184, 2017.

TUKVADZE, N.; BABLISHVILI, N.; APSINDZELASHVILI, R.; BLUMBERG, H. M.; KEMPKER, R. R. Performance of the MTBDRsl Assay in the Country of Georgia. **Int J Tuberc Lung Dis.**, v. 18, n. 2, p. 233–239, 2015.

VELAYATI, A. A.; MASJEDI, M. R.; FARNIA, P.; TABARSI, P.; GHANAVI, J.; ZIAZARIFI, A. H.; HOFFNER, S. E. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli. **Chest**, v. 136, 2009.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WONG, S. Y.; LEE, J. S.; KWAK, H. K.; VIA, L. E.; BOSHOFF, H. I. M.; BARRY, C. E. Mutations in gidB confer low-level streptomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2515–2522, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policy guidance on drug- susceptibility testing

of second-line antituberculosis drugs. **The Stop TB**, p. 1–20, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB). **Global Report on Surveillance response**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. **World Health Organization**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Report 2016. **Cdc 2016**, n. Global TB Report 2016, p. 214, 2016a. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0%0Ahttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+title%230>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). **Burden, Global Treatment, Enrollment O N Mdr-tb Outcomes, Treatment**, 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis: 2016 update. **The End TB Strategy**, n. October, p. 56, 2016c. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/250125>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**. [s.l: s.n.].

XIE, Y. L.; CHAKRAVORTY, S.; ARMSTRONG, D. T.; HALL, S. L.; VIA, L. E.; SONG, T.; YUAN, X.; MO, X.; ZHU, H.; XU, P.; GAO, Q.; LEE, M.; LEE, J.; SMITH, L. E.; CHEN, R. Y.; JOH, J. S.; CHO, Y. S.; LIU, X.; RUAN, X.; LIANG, L.; DHARAN, N.; CHO, S.-N.; III, C. E. B.; ELLNER, J. J.; DORMAN, S. E.; ALLAND, D. Evaluation of a Rapid Molecular Drug- Susceptibility Test for Tuberculosis. **The new england journal o f medicine**, v. 377, p. 1043–1054, 2017.

YANG, J.; LIU, Y.; BI, J.; CAI, Q.; LIAO, X.; LI, W.; GUO, C.; ZHANG, Q.; LIN, T.; ZHAO, Y.; WANG, H.; LIU, J.; ZHANG, X.; LIN, D. **Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide**. [s.l: s.n.]v. 95

ZAINUDDIN, Z. F.; DALE, J. W. Does Mycobacterium tuberculosis have plasmid? **Tubercle**, v. 71, p. 43–49, 1990.

ZARIR F. UDWADIA; AMALE, R. A.; AJBANI, K. K.; RODRIGUES, C. Totally

Drug-Resistant Tuberculosis in India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 579–581, 2012. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/>>.

ZAUNBRECHER, M. A.; SIKES, R. D.; METCHOCK, B.; SHINNICK, T. M.; POSEY, J. E. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 47, p. 20004–20009, 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0907925106>>.

Capítulo II

Artigos publicados durante o mestrado

CIOL, M. R.; MANZANO, C. M.; CUIN, A.; PAVAN, F. R.; RIBEIRO, C. M.; RUIZ, A. L. T. G.; DE OLIVEIRA, E. C. S.; LUSTRI, W. R.; FREGONEZI, N. F.; NOGUEIRA, F. A. R.; CORBI, P. P. A Silver Complex with Cycloserine: Synthesis, Spectroscopic Characterization, Crystal Structure and In Vitro Biological Studies. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 6, p. 1719–1726, 2018.

DA SILVA, P. B.; CAMPOS, D. L.; RIBEIRO, C. M.; DA SILVA, I. C.; PAVAN, F. R. New antimycobacterial agents in the pre-clinical phase or beyond: recent advances in patent literature (2001–2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2016.

DOS SANTOS FERNANDES, G. F.; DE SOUZA, P. C.; MORENO-VIGURI, E.; SANTIVANEZ-VELIZ, M.; PAUCAR, R.; PÉREZ-SILANES, S.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; LAZZARATO, L.; FRUTTERO, R.; MAN CHIN, C.; DA SILVA, P. B.; CHORILLI, M.; SOLCIA, M. C.; RIBEIRO, C. M.; SILVA, C. S. P.; MARINO, L. B.; BOSQUESI, P. L.; HUNT, D. M.; DE CARVALHO, L. P. S.; DE SOUZA COSTA, C. A.; CHO, S. H.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; PAVAN, F. R.; DOS SANTOS, J. L. Design, Synthesis, and Characterization of N-Oxide-Containing Heterocycles with in Vivo Sterilizing Antitubercular Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 8647–8660, 2017.

MANDA, B. R.; AVVARI, N. P.; THATIKONDA, N. R.; LACERDA-JR, V.; BARBOSA, L. R.; SANTOS, H.; ROMÃO, W.; PAVAN, F. R.; RIBEIRO, C. M.; SANTOS, E. dos A.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P.; MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Synthesis, Antibacterial and Antitubercular Evaluation of Cardanol and Glycerol-Based β -Amino Alcohol Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical society**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

SCALACCI, N.; BROWN, A. K.; PAVAN, F. R.; RIBEIRO, C. M.; MANETTI, F.; BHAKTA, S.; MAITRA, A.; SMITH, D. L.; PETRICCI, E.; CASTAGNOLO, D. Synthesis and SAR evaluation of novel thioridazine derivatives active against drug-resistant tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 147–158, 2017.